

НАБОР ИФА
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ К КАРДИОЛИПИНУ,
ФОСФАТИДИЛ СЕРИНУ, ФОСФАТИДИЛ
ИНОЗИТОЛУ И ФОСФАТИДИЛОВОЙ
КИСЛОТЕ (IgG И/ИЛИ IgM)

EIA-3591, Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM ELISA

Каталог. № : EIA-3591
Количество : 96
Производитель: DRG (США)

Методика от 06-2011
Версия 5.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Настоящий набор является количественным ИФА для скрининга антител класса IgG и/или IgM к кардиолипину, фосфатидил серину, фосфатидил инозитолу, фосфатидиловой кислоте и β -гликопротеину I в сыворотке или плазме как средство диагностики увеличения риска тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой или аналогичными расстройствами.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

(См. в оригинале инструкции).

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Смесь высокоочищенных Кардиолипина, фосфатидил серина, фосфатидил инозиолола, фосфатидиловой кислоты и человеческого β -2-гликопротеина I нанесена в лунки. Антитела к этим антигенам, если они присутствуют в разбавленной сыворотке или плазме, связываются с соответствующим антигеном. Промывка лунок удаляет неспецифические компоненты сыворотки и плазмы. Peroксидаза хрена (HRP), конъюгированная с анти-человеческими IgG и IgM, иммунологически обнаруживает связанные антитела пациента, формируя комплекс конъюгат/антитело/антиген. Промывка лунок удаляет не связанный конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связанного конъюгата гидролизует с образованием синей окраски. Добавление кислоты останавливает реакцию с образованием желтого конечного продукта. Интенсивность этого желтого цвета измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации антител IgG и IgM соответственно, присутствующих в исходном образце.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Все реагенты данного набора предназначены только для диагностики *in vitro*.
2. Не смешивайте компоненты наборов с разными номерами лотов.
3. Набор содержит компоненты человеческого происхождения. Тестирование подтвердило отсутствие в них поверхностного антигена гепатита В и антител к ВИЧ. Тем не менее, ни один из существующих методов не может гарантировать, что продукты человеческой крови не инфицированы и необходимо рассматривать их, как таковые.
4. Избегать контакта между буферным раствором и легко окисляющимися материалами. При контакте TMB с участком кожи необходимо тщательно промыть его водой с мылом.
5. Избегать контакта со стоп-раствором, который является кислотой. Если он вступает в контакт с кожей, тщательно промойте водой и обратитесь за медицинской помощью.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буферный промывочный раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) является высокотоксичным и реактивным в чистом виде. При концентрации продукта (0,09%) не опасен. Несмотря на классификацию как неопасный, мы настоятельно рекомендуем следовать правилам лабораторной практики (см 8, 9, 10).
7. Некоторые компоненты набора содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Проклин 300, смывать с большим количеством воды, чтобы разбавить компоненты ниже активных уровней.
8. Используйте одноразовые перчатки при работе с образцами или реагентами и тщательно мойте руки после этого.

9. Не пипетировать ртом.
 10. Не есть, не пить, не курить или наносить макияж в тех областях, где находятся образцы или реагенты набора.
 11. Избегайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляющимися материалами; экстремальные температуры могут инициировать самовозгорание.
- Соблюдайте принципы для осуществления контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа контроля и/или объединенных сывороток.

5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Кол-во определений - 96

- | | |
|---------------------------|--|
| 1 планшет | Делимый микропланшет, состоящий из 12 модулей по 8 лунок каждый, покрытых высоко очищенными фосфолипидами: Кардиолипина, фосфатидил серина, фосфатидил инозиолола, фосфатидиловой кислоты, насыщенной человеческим β -гликопротеином I. <i>Готовы к использованию.</i> |
| 6 флаконов, 1,5 мл каждый | Комбинированные Анти-фосфолипидные Калибраторы в сывороточной/буферной матрице (PBS, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (вес/вес)), содержащие:
IgG: 0; 6.3; 12.5; 25; 50 и 100 GPL Ед/мл и
IgM: 0; 6.3; 12.5; 25; 50 и 100 MPL Ед/мл. <i>Готовы к использованию.</i> |
| 2 флакона, 1,5 мл каждый | Анти-фосфолипидные Контроли Анти-кардиолипина в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (вес/вес)). Положительный (1) и Отрицательный (2), соответствующие концентрации см. прилагаемую QC вставку. <i>Готовы к использованию.</i> |
| 1 флакон, 20 мл | Буфер для образцов (Трис, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (вес/вес)), желтый, концентрат (5x). |
| 1 флакон, 15 мл | Раствор ферментного конъюгата (PBS, Проклин 300 $< 0,5\%$ (объем/объем)), (светло-красный), содержащий поликлональные античеловеческие IgG ; меченные пероксидазой хрена. <i>Готов к использованию.</i> |
| 1 флакон, 15 мл | Раствор ферментного конъюгата (PBS, Проклин 300 $< 0,5\%$ (объем/объем)), (светло-красный), содержащий поликлональные античеловеческие IgM ; меченные пероксидазой хрена. <i>Готов к использованию.</i> |
| 1 флакон, 15 мл | Раствор субстрата TMB. <i>Готов к использованию.</i> |
| 1 флакон, 15 мл | Стоп-раствор (1M соляной кислоты). <i>Готов к использованию.</i> |
| 1 флакон, 20 мл | Промывочный раствор (PBS, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (вес/вес)), концентрат (50x). |

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Набор хранить при 2-8 °С.
2. Лунки хранить запечатанными в сухой упаковке с влагопоглотителем.
3. Реагенты стабильны до окончания срока годности.
4. Не подвергать влиянию прямых солнечных лучей и тепла.
5. Разбавленные буфер для образцов и промывочный буфер стабильны до 30 дней при хранении при 2-8 °С.

7. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Ридер для измерений при 450 нм
- Мультиканальный диспенсер или пипетка на 100 мкл
- Вortexный миксер
- Пипетки на 10 мкл, 100 мкл и 1000 мкл
- Таймер
- Компьютерная программа для обработки данных

Подготовка реагентов

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Градуированная емкость на 100 и 1000 мл
- Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

8. ЗАБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Забрать образцы цельной крови, избегая гемолиза.
2. Дать крови свернуться и отделить сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть прозрачной и негемолизированной. Избегать гемолиза или липемии; хотя это не влияет на проведение анализа.
4. Образцы хранить при 2 - 8 °С по крайней мере 5 дней. До шести месяцев образцы могут храниться замороженными при -20 °С.
5. Избегать повторного замораживания-оттаивания образцов сыворотки.
6. Не рекомендуется тестирование образцов, деактивированных теплом.

9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Не использовать компоненты набора после окончания срока годности.

- Не смешивайте компоненты наборов с разными номерами лотов.
- Перед использованием необходимо довести реагенты до комнатной температуры.
- Подготовить все образцы и реагенты до начала анализа. После начала анализа, проводить его непрерывно для получения надежных результатов.
- Соблюдать порядок проведения теста.
- Использовать только свежеразведенные образцы.
- Пипетировать все реагенты и образцы на дно лунок.
- Во избежание загрязнения, менять наконечники для образцов и контролей.
- Тщательно мыть микролунки и просушивать их.
- Проводить все шаги инкубации с одинаковым промежутком времени.
- Тестировать контрольные сыворотки или пулы для проверки работы реагентов и теста.
- Не использовать лунки повторно.

Для всех контролей соответствующие концентрации указаны на этикетках. При использовании этих данных может быть построена калибровочная кривая для полуколичественного определения результатов.

10. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовка буфера для образцов

Развести содержимое каждого флакона концентрата буфера для образцов (5x) дистиллированной водой до общего объема 100 мл перед использованием. Хранить в холодильнике: стабилен при 2-8 °С по крайней мере 30 дней или до даты срока годности, указанного на упаковке.

Подготовка промывочного раствора

Развести содержимое каждого флакона концентрата промывочного раствора (50x) дистиллированной водой до объема 1000 мл перед использованием. Хранить в холодильнике: стабильны при 2-8 °С по крайней мере 30 дней или до даты срока годности, указанного на упаковке.

Подготовка образца

Развести все образцы пациентов 1:100 с разбавителем для образцов. Для этого соединить 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в пробирке и тщательно перемешать.

Контроли готовы к использованию. Не разбавлять.

11. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

- Подготовить необходимое количество стрипов для калибраторов, контролей и разведенных образцов пациентов.
- Пипетировать **100 мкл** калибраторов, контролей и разведенных образцов в дублях в соответствующие лунки.

	1	2	3	4	5	6	
A	SA	SE	P1	P5			SA-SF: standards A to F P1, P2...C: patient sample 1, 2 ... C1: positive control C2: negative control
B	SA	SE	P1	P5			
C	SB	SF	P2	P..			
D	SB	SF	P2	P..			
E	SC	C1	P3				
F	SC	C1	P3				
G	SD	C2	P4				
H	SD	C2	P4				

- Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (20-28 °С).
- Удалить содержимое лунок и промыть **3 раза 300 мкл** промывочного раствора.
- Пипетировать **100 мкл** раствора ферментного конъюгата (античеловеческие IgG или античеловеческие IgM) в каждую лунку.
- Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.
- Удалить содержимое лунок и промыть **3 раза 300 мкл** промывочного раствора.
- Пипетировать **100 мкл** раствора ТМБ в каждую лунку.
- Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.
- Добавить **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку и оставить на 5 минут.
- Читать оптическую плотность при **450 нм** и подсчитать результаты. Рекомендуется бихроматическое измерение при 600-690 нм.

Цвет реакции стабилен 30 минут. Оптическую плотность необходимо считать за этот период времени.

12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

12.1 Контроль качества

Тест считается действительным только, если оптическая плотность при 450 нм для Положительного Контроля (1) и Отрицательного

Контроля (2), а также для Калибраторов А и F совпадают с указанными диапазонами.

12.2 Подсчет результатов

Для данного анализа рекомендуется использовать 4-параметровую функцию с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации.

Подсчитайте значения оптической плотности для каждой калибровочной лунки. На линейно-логарифмической бумаге отметьте усредненные значения оптической плотности каждого калибратора против его концентрации. Постройте стандартную кривую. Концентрации образцов можно высчитать путем интерполяции по стандартной кривой.

Пример расчетов

Данные, приведенные ниже, могут использоваться только в качестве иллюстрации.

anti-PL	No	Position	OD 1	OD 2	Mean	Conc. 1	Conc. 2	Mean	decl.	Conc.	CV %
IgG	STA	A 1/B 1	0.051	0.049	0.050	0.3	0.1	0.2	0.0	3	
IgG	STB	C 1/D 1	0.163	0.160	0.161	6.4	6.3	6.3	6.3	1	
IgG	STC	E 1/F 1	0.310	0.273	0.291	12.8	11.2	12.0	12.5	9	
IgG	STD	G 1/H 1	0.603	0.630	0.616	25	26	26	25	3	
IgG	STE	A 2/B 2	1.122	1.054	1.088	51	47	49	50	4	
IgG	STF	C 2/D 2	1.742	1.787	1.765	98	103	101	100	2	
IgM	STA	A 7/B 7	0.022	0.021	0.022	0.2	0.1	0.2	0.0	3	
IgM	STB	C 7/D 7	0.211	0.205	0.208	6.1	6.0	6.1	6.3	2	
IgM	STC	E 7/F 7	0.465	0.462	0.464	13.0	12.9	13.0	12.5	0	
IgM	STD	G 7/H 7	0.788	0.879	0.833	23	26	24	25	8	
IgM	STE	A 8/B 8	1.411	1.382	1.397	52	50	51	50	1	
IgM	STF	C 8/D 8	1.868	1.852	1.860	101	98	99	100	1	

12.3 Интерпретация результатов

В изучении в нормальных диапазонах были получены следующие значения:

	Антитела к фосфолипидам	
	IgG [GPL Ед/мл]	IgM [MPL Ед/мл]
норма:	< 10	< 10
повышенные:	≥ 10	≥ 10

Положительные результаты должны быть проверены в отношении со всем клиническим статусом пациента. Также каждое решение для терапии следует принимать индивидуально.

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные нормальные и патологические диапазоны сыворотки анти-кардиолипина. Значения ниже следует рассматривать исключительно в качестве примера.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

13.1 Параллелизм

В исследованиях на разведение сывороток концентрации IgG- и IgM-антител разводились буфером для образцов и тестировались на данном наборе. Набор показывает линейность на всем диапазоне измерений.

13.2 Чувствительность

Нижний предел обнаружения для анти-Фосфолипид Скрининг IgG и IgM дал чувствительность 0.5 Ед/мл.

13.3 Специфичность

Микропланшет покрыт смесью высокоочищенных Кардиолипина, фосфатидил серина, фосфатидил инозитола, фосфатидилового кислоты и человеческого β2-гликопротеина I. Специальные процессы нанесения, разработанные производителем, гарантируют естественную иммуногенную структуру фосфолипидов после иммобилизации на твердой фазе.

Данный набор специфичен для аутоантител к фосфолипидам, β2-Гликопротеину I или комплексу отрицательных фосфолипидов и β2-Гликопротеину I. Перекрестной реактивности не наблюдалось с антителами анти-ДНК и теми типами антител, развивающимися с Сифилисом.

13.4 Калибровка

Данная система калибруется относительно международно признанной контрольной сыворотки от EN Харрис, Луисвилл, США, IRP 97/656 и HCAL/EY2C9.

14. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Анти-Фосфолипид Скрининг IgG/IgM ELISA является диагностическим анализом. Определенный клинический диагноз не должен основываться на результатах одного теста, но должен быть сделан врачом после всех клинических и лабораторных исследований.

15. ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ СУБСТАНЦИИ

Интерференция не наблюдалась при реакции с гемолитическими (до 1000 мг/дл), липемическими (до 3 г/дл триглицеридов) или билирубином (до 40 мг/дл) образцами сыворотки. Антикоагулянты также не влияют на результаты.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com